



prof. dr hab. Monika Pitucha
u. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
tel.: 81-448-72-40
e-mail: monika.pitucha@umlub.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Karoliny Koprowskiej

**pt. „Nowe metody znakowania związków o znaczeniu biologicznym znacznikami
fluorescencyjnymi i metalokarbonyłowymi”**

wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Promotor dr hab. Bogny Rudolf, prof. UŁ oraz Promotor pomocniczej dr hab. Anny Wrona-Piotrowicz, prof. UŁ

Postęp technologiczny oraz rozwój medycyny zwiększają zapotrzebowanie na czułe i selektywne metody detekcji biomolekuł, które umożliwiają lepsze zrozumienie procesów zachodzących w komórkach. Precyzyjna identyfikacja i monitorowanie zmian metabolicznych czy ekspresji markerów biologicznych są kluczowe zarówno w diagnostyce, jak i w ocenie skuteczności terapii, zwłaszcza w chorobach nowotworowych. Dlatego konieczne jest opracowywanie nowych narzędzi analitycznych i znaczników molekularnych, które pozwolą na dokładniejszą wizualizację i interpretację procesów na poziomie molekularnym, wspierając rozwój terapii celowanych oraz spersonalizowanej medycyny.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska doskonale wpisuje się w ten nurt badań ponieważ dotyczy problematyki z zakresu projektowania, syntezy i oceny nowych znaczników chemicznych do zastosowań biologicznych i medycznych, w szczególności w diagnostyce, bioobrazowaniu oraz badaniach procesów zachodzących w komórkach nowotworowych. Głównym przedmiotem badań są metalokarbonyłowe oraz fluorescencyjne znaczniki molekularne, modyfikacja biomolekuł (głównie białek) z wykorzystaniem reakcji z grupami –SH i strategii rebridgingu mostków dwusiarczkowych, ocena właściwości fotofizycznych, bioortogonalnych i biologicznych otrzymanych związków. Podjęta tematyka jest aktualna i istotna z punktu widzenia rozwoju współczesnych badań chemicznych oraz odpowiada aktualnym trendom badawczym w tej dyscyplinie.

Cel i zakres badań

Celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Koprowskiej było opracowanie, synteza oraz ocena nowych narzędzi chemicznych do znakowania biomolekuł i cząsteczek wykazujących aktywność biologiczną, umożliwiających ich nieinwazyjną detekcję metodami spektroskopowymi, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowań w diagnostyce i bioobrazowaniu. W ramach realizacji celu głównego Doktorantka wytyczyła następujące zadania badawcze:

- a) opracowanie metody modyfikacji biomolekuł przy użyciu pochodnych bromo- i dibromomaleimidu, w tym związków zawierających fragment metalokarbonylowy,
- b) modyfikacja białek typu rebridging, polegająca na wbudowaniu fragmentu maleimidu lub sukcyimidu w mostek dwusiarczkowy,
- c) zaprojektowanie i synteza fluorescencyjnych znaczników molekularnych zawierających fluorofor pirenowy oraz bioortogonalny układ cyklooktynowy zdolny do reakcji typu „click”,
- d) ocena właściwości otrzymanych pochodnych maleimidu zawierających pierścieni pirenu jako potencjalnych znaczników biocząsteczek,
- e) przeprowadzenie nieinwazyjnej detekcji otrzymanych biokoniugatów przy użyciu spektroskopii IR oraz spektroskopii emisyjnej.

Realizacja powyższych celów umożliwiła opracowanie nowych strategii znakowania biomolekuł oraz ocenę ich przydatności aplikacyjnej w kontekście metod diagnostycznych i bioobrazowania. Zakres pracy jest adekwatny do postawionego celu i obejmuje zarówno część teoretyczną, jak i szeroko zakrojone badania eksperymentalne.

Struktura rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Koprowskiej ma formę monografii składającej się z sześciu rozdziałów: celu pracy, części literaturowej obejmującej bioobrazowanie oraz wybrane znaczniki cząsteczek biologicznie aktywnych, części badawczej zawierającej obszerne podsumowanie, części eksperymentalnej oraz bibliografii. Do pracy dołączony został wykaz skrótów, streszczenie i abstrakt, dorobek naukowy Doktorantki oraz publikacja. Całość liczy 191 stron maszynopisu. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Poszczególne rozdziały podzielone na liczne podrozdziały tworzą spójną całość, umożliwiając czytelnikowi analizę i interpretację prezentowanych przez Autorkę wyników badań. Doktoranta zachowała prawidłowe proporcje pomiędzy częścią literaturową, eksperymentalną i opisem wyników. Struktura pracy jest adekwatna do założonych celów.

Część literaturowa została opracowana rzetelnie i w sposób wyczerpujący. Autorka wykazała się dobrą znajomością aktualnego piśmiennictwa, obejmującego zarówno klasyczne, jak i najnowsze doniesienia naukowe. Obszerne przeglądy literatury (159 pozycji) potwierdza bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do realizacji podjętych badań oraz jednoznacznie wskazuje na istnienie luki badawczej, którą skutecznie wypełniają przedstawione przez mgr Karolinę Koprowską badania własne.

Część doświadczalna stanowi istotny element rozprawy. Zastosowane metody badawcze zostały dobrane właściwie, a ich opis jest kompletny i umożliwia powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. Procedury syntezy, warunki reakcji, metody oczyszczania oraz uzyskane wydajności zostały przedstawione w sposób czytelny i poprawny metodycznie. Do identyfikacji i charakterystyki otrzymanych związków mgr Karolina Koprowska zastosowała odpowiedni zestaw metod analitycznych, w tym spektroskopię ^1H oraz ^{13}C NMR. Pewnego doprecyzowania wymaga jednak kwestia rejestracji widm NMR w różnych rozpuszczalnikach deuterowanych. W pracy nie wyjaśniono jednoznacznie z czego to wynikało. Pewien niepokój budzi również fakt, że dla części otrzymanych związków nie podano temperatur topnienia, a także nie przedstawiono widm ^{13}C NMR ani danych ze spektrometrii mas. Braki te nie zostały

w pracy wystarczająco uzasadnione. Z kolei dla kilku otrzymanych pochodnych Doktorantka potwierdziła przypisywaną strukturę cząsteczek na podstawie porównania uzyskanych widm NMR z danymi literaturowymi. Rodzi to pytanie, czy związki te były wcześniej znane i opisane w literaturze, czy też porównanie to miało charakter pomocniczy i dotyczyło jedynie fragmentów strukturalnych. Niewątpliwym atutem pracy są badania rentgenostrukturalne, które w sposób jednoznaczny potwierdziły strukturę wybranych produktów oraz dostarczyły cennych informacji dotyczących oddziaływań występujących na poziomie molekularnym. Istotnym uzupełnieniem kompleksowej charakterystyki otrzymanych związków są także badania biologiczne z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, pozwalające na analizę lokalizacji komórkowej badanych układów oraz ocenę ich zdolności do penetracji wnętrza komórek.

Cześć badawcza obejmuje omówienie wyników badań oraz podsumowanie. Badania zostały bardzo dobrze zaplanowane i konsekwentnie realizowane na wszystkich etapach pracy. Koncepcja badań charakteryzuje się logicznym układem, a kolejne eksperymenty były prowadzone w sposób przemyślany i wzajemnie się uzupełniały. Badania zostały zaplanowane w sposób konsekwentny – od projektu cząsteczki, przez syntezę i charakterystykę fizykochemiczną, aż po ocenę właściwości fotofizycznych i biologicznych, co świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Doktorantka wykazała się umiejętnością właściwego doboru metod badawczych oraz dużą samodzielnością w rozwiązywaniu pojawiających się problemów eksperymentalnych, co zaowocowało uzyskaniem wartościowych i spójnych wyników. Biorąc pod uwagę różnorodność otrzymanych związków oraz szeroki zakres przeprowadzonych badań, należy podkreślić niezwykle duży nakład pracy badawczej wykonanej przez Doktorantkę. Synteza licznych związków reprezentujących odmienne grupy chemiczne, w tym także biokonjugatów, połączona z ich wnikliwą analizą właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych, stanowiła zadanie wyjątkowo ambitne i wymagające. Pani mgr Karolina Koprowska w pełni sprostała temu wyzwaniu, wykazując się wysokimi kompetencjami merytorycznymi, samodzielnością badawczą oraz doskonałym przygotowaniem warsztatowym. Jej warsztat pracy naukowej zasługuje na najwyższe uznanie i szczególne wyróżnienie. Doktorantka zastosowała adekwatny i bogaty zestaw metod (NMR, IR, HRMS, UV-Vis, fluorescencja, pomiary czasów życia, mikroskopia konfokalna), co zapewnia wysoką wiarygodność uzyskanych wniosków. Walorem pracy są bardzo starannie opracowane schematy, tabele oraz ryciny. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnej interpretacji rezultatów oraz ich krytycznej analizy. Zakończeniem tego rozdziału jest obszerne podsumowanie, które stanowi raczej streszczenie pracy. Zabrakło mi jednak kilku wniosków. Czy Doktorantka mogłaby w trakcie publicznej obrony sformułować 3–4 kluczowe wnioski płynące z przeprowadzonych badań?

Mocne strony pracy:

1. Przeprowadzone badania stanowią kompleksowe opracowanie obejmujące projektowanie, syntezę, charakterystykę fizykochemiczną i fotofizyczną oraz ocenę aktywności biologicznej nowych pochodnych maleimidu, ditiomaleimidu oraz układów pirenowych przeznaczonych do zastosowań w chemii bioorganicznej, bioortogonalnej i biologii chemicznej.

2. Wykazano, że pochodne bromo i dibromomaleimidu, zarówno organiczne, jak i zawierające fragment metalokarbonylowy, stanowią efektywne reagenty do selektywnej modyfikacji biocząsteczek zawierających grupy tiolowe. Reakcje z cysteiną, glutationem oraz białkami modelowymi prowadzą do otrzymania stabilnych pochodnych tio i ditiomaleimidu oraz biokoniugatów otrzymywanych na drodze rebridgingu mostków dwusiarczkowych, potwierdzając użyteczność tych układów w chemii białek.
3. Wykazano istotny wpływ fragmentu metalokarbonylowego na właściwości fizykochemiczne i biologiczne otrzymanych związków. Pochodne zawierające fragment metalokarbonylowy wykazują brak fluorescencji, lecz mogą być łatwo wykrywane metodą spektroskopii IR, natomiast ich analogi organiczne charakteryzują się właściwościami fluorescencyjnymi. Kluczowym osiągnięciem pracy jest wykazanie, że metalokarbonyłowe pochodne ditiomaleimidu pod wpływem światła widzialnego ulegają fotodegradacji z uwolnieniem tlenku węgla i jednoczesnym powstaniem fluorescencyjnych form organicznych. Otrzymane związki stanowią pierwszy przykład znaczników, które mogą być fotochemicznie przekształcane ze znaczników wykrywanych metodą IR w znaczniki fluorescencyjne, oraz nową klasę związków typu photo CORMs.

Przedstawiona do oceny rozprawa mgr Karoliny Koprowskiej napisana jest poprawnym językiem naukowym, z zachowaniem właściwej terminologii chemicznej. Część graficzna (schematy, widma, ryciny) została przygotowana starannie. Praca nie zawiera istotnych uchybień redakcyjnych. Co prawda pojawiły się drobne błędy językowe, powtórzenia i niekonsekwencje terminologiczne, ale nie mają one wpływu na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Nieliczne zagadnienia i pytania mogą stanowić przedmiot dyskusji podczas obrony:

1. Aktywność biologiczna została oceniona na jednej linii nowotworowej (MDA MB 231) oraz jednej linii prawidłowej, co nie pozwala na pełną ocenę selektywności i potencjału terapeutycznego związków. Czy planowane są dalsze badania?
2. Obecność fragmentu metalokarbonylowego istotnie wpływa na cytotoksyczność, zdolność przenikania do komórek oraz sposób detekcji związków (fluorescencja). Czy efekt biologiczny wynika tylko z uwalniania CO, czy również z właściwości transportowych i lipofilowych fragmentu organometalicznego?
3. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że charakter chemiczny łączyka pomiędzy pirenem a cyklooktynem ma kluczowe znaczenie dla emisji fluorescencji. Czy planowane jest projektowanie przyszłych znaczników w celu dalszej optymalizacji ich właściwości?

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe. Doktoranta wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz interpretacji uzyskanych wyników. Rozprawa doktorska wnosi oryginalny wkład do rozwoju dyscypliny nauk chemicznych. Praca jest nowatorska, a uzyskane wyniki mają wartość poznawczą i potencjał do dalszych badań naukowych.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska autorstwa mgr Karoliny Koprowskiej pt. „*Nowe metody znakowania związków o znaczeniu biologicznym znacznikami fluorescencyjnymi i metalokarbonyłowymi*” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie pani mgr Karoliny Koprowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Na podstawie analizy przedstawionej rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Koprowskiej stwierdzam, że praca ta znacznie wykracza poza standardowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Badania zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób wyjątkowo dojrzały, spójny i samodzielny, obejmując racjonalne projektowanie związków, ich syntezę, wnikliwą charakterystykę fizykochemiczną i fotofizyczną oraz ocenę właściwości biologicznych. Uwzględniając bardzo duży nakład pracy badawczej, wysoki poziom metodologiczny oraz istotną wartość poznawczą i potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Koprowskiej.

Prof. dr hab. Monika Pitucha

Lublin, 13.04.2026r.